



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Nuevo método de prevención y tratamiento de la vid contra el
oídio

Autor/es

CARLOS HERNANDO LOZA

Director/es

MARÍA FERNANDA RUIZ LARREA , ROSA LÓPEZ MARTÍN y M^a PATROCINIO
GARIJO ,

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

Grado en Enología

Departamento

AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

Curso académico

2018-19



Nuevo método de prevención y tratamiento de la vid contra el oídio, de
CARLOS HERNANDO LOZA
(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative
Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.
Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los
titulares del copyright.

Nuevo método de prevención y tratamiento de la vid contra el oídio

Trabajo de Fin de Grado, Grado en Enología

CARLOS HERNANDO LOZA, 2019



Este trabajo, aunque forma parte de un proyecto mucho más amplio, en ningún caso podría haberse visto realizado sin la inestimable ayuda de Rosa y Fernanda; sin la paciencia de Patri y Rocío en el laboratorio, sin el apoyo mostrado por Pilar y el resto del equipo del ICVV, y sobre todo sin haberme acogido tan bien. Ha sido un placer trabajar con vosotros.

Sois un gran equipo.

¡Muchas gracias!

Contenido

Abreviaturas	3
RESUMEN/Abstract.....	5
CAPÍTULO 1. Introducción	7
1.1. Oídio (<i>Uncinula necator</i>)	8
1.2. Bacterias del género <i>Bacillus</i> para el control biológico de plagas	9
1.3. Levaduras y fermentación espontánea	11
1.4. Bacterias lácticas	13
CAPÍTULO 2. Objetivos	14
CAPÍTULO 3. Materiales y métodos	16
3.1. Diseño experimental	17
3.2. Métodos de identificación de levaduras	18
3.2.1. Métodos de identificación de clones de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
3.2.2. Métodos de identificación de levaduras del tipo <i>no-Saccharomyces</i>	20
3.3. Métodos de identificación de bacterias lácticas	21
3.3.1. Métodos de identificación de clones de <i>Oenococcus oeni</i>	22
CAPÍTULO 4. Resultados y discusión	23
4.1. Desarrollo de las fermentaciones	24
4.1.1. Desarrollo de la fermentación alcohólica	24
4.1.2. Desarrollo de la fermentación maloláctica	26
4.2. Caracterización clonal	27
4.2.1. Caracterización clonal de levaduras en fermentación alcohólica	27
4.2.2. Caracterización clonal de bacterias	31
4.3. Resultados de análisis enológicos y de producción de uva	33
4.3.1. Resultados de la producción de uva	33
4.3.2. Análisis de datos enológicos del mosto	34
4.3.3. Análisis de datos enológicos de los vinos	35
4.4. Diversidad microbiana	35
CAPÍTULO 5. Conclusiones	37
Referencias	39
ANEXO I. Parcela de ensayo. Datos agronómicos	42
ANEXO II. Tablas de datos	45
ANEXO III. Medios de cultivo y soluciones	48

Abreviaturas

Abs.	Absorbancia
Ac.	Acidez, ácido
ATP	Adenosín trifosfato
°C	Grados centígrados o grados Celsius
C.A.	Comunidad Autónoma
CIDA	Centro de Investigación y Desarrollo Agrario
UE	Unión Europea
cm	Centímetro
csp	Cantidad suficiente para
d	Densidad
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAmt	DNA mitocondrial
D.O.Ca.	Denominación de Origen Calificada
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FA	Fermentación alcohólica
FML	Fermentación maloláctica
g	Gramo
h	Hora
ha	Hectárea
ID	Índice de diversidad
I.C.	Intensidad de color
ICVV	Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino
I.P.T.	Índice de polifenoles totales
Kb	Kilobase
kg	kilogramo
km	Kilómetro
Kpb	Kilopares de bases
L	Litro
L.	Linneo (nomenclatura especies)
M	Molar
m	Metro
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar

N	Normal
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
p/v	Relación peso/volumen
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SIV	Servicio de Investigación Vitivinícola
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TBE	Tris borato EDTA
TE	Tris EDTA
ufc	Unidades formadoras de colonias
V	Voltio
v/v	Relación volumen/volumen
μl	Microlitro
μm	Micrometro (micra)
μg	Microgramo

RESUMEN/Abstract

El óidio es una enfermedad criptogámica de la vid endémica de La Rioja. Su tratamiento y control supone un problema económico y medioambiental. Se están desarrollando nuevos tratamientos biológicos más respetuosos con el medio ambiente que intenten desplazar a los clásicos de síntesis química.

En este proyecto se valora el empleo de un microorganismo, el *Bacillus pumilus*, y se estudia su efecto en diversos aspectos tanto enológicos como microbiológicos del mosto y el vino, y en las fermentaciones alcohólica y maloláctica espontáneas.

El tratamiento resultó no influir negativamente en la calidad de la uva, no afectó al desarrollo de la fermentación alcohólica y mejoró la cinética de la fermentación maloláctica.

Además, aumentó la diversidad clonal de las cepas de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* e influyó en la de *Oenococcus oeni*.

Powdery mildew is a grapevine cryptogamic disease, which is endemic in La Rioja. Its management and control entails an economic and environmental issue. New environmentally-friendly biological treatments are being developed so as to replace the old ones, produced by chemical synthesis processes.

This study assesses the use of a microorganism, *Bacillus pumilus*, and its effect on both microbiologic and oenologic parameters; and in spontaneous alcoholic and malolactic fermentation as well.

This treatment turned out to be not relevant neither to alcoholic fermentation development or to grape quality, though it improved malolactic kinetics.

In addition, it increased clonal diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts strains and modified the clonal population of *Oenococcus oeni*.

CAPÍTULO 1.

Introducción

1.1. Oídio (*Uncinula necator*)

El oídio, *Uncinula necator*¹, es una enfermedad criptogámica de la vid, presente en la mayor parte de los viñedos del mundo. Regularmente provoca daños importantes e impone modelos de lucha específicos en cada zona y parcela. En La Rioja constituye una plaga endémica, por lo tanto su lucha será de forma preventiva, para evitar que se instale en la parcela.

Siendo *U. necator* un hongo ectoparásito, su micelio se localiza en el exterior de los tejidos vegetales, a los que se adhiere con unos órganos prensores y chupadores (haustorios) que extraen el alimento de las células. La temperatura, humedad, y en menor medida la insolación, son los factores climáticos que condicionan el desarrollo del hongo.

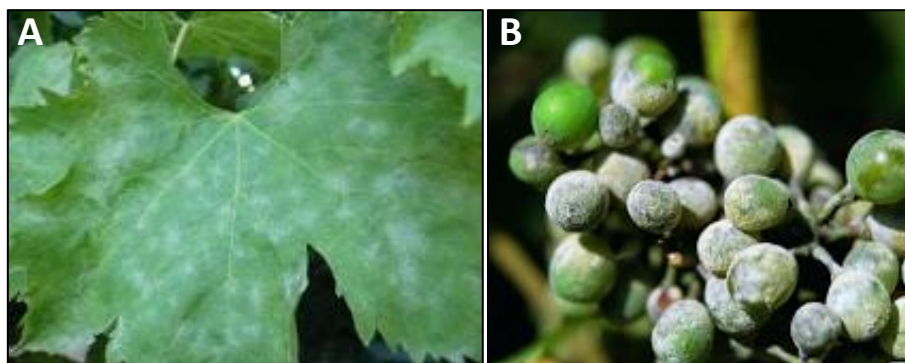


Figura 1. Síntomas de *U. necator* en vid, en hoja (A) y en racimo (B).²

Los primeros síntomas son difíciles de ver a veces, aparecen tenues puntos o lunares amarillos de pequeño tamaño, que van creciendo pasando posteriormente a zonas con un recubrimiento grisáceo. El borde del limbo se deforma y se produce un abarquillamiento hacia el haz de la hoja. Estas hojas se vuelven blancas de la cantidad de cadenas de esporas del hongo, que posteriormente serán diseminadas por el aire. Las hojas muy atacadas no crecen y se secan. El oídio ataca a las hojas, brotes y frutos de la vid conforme ésta crece, mostrando los siguientes síntomas (Arias *et al.*, 2004):

- En hojas, los síntomas pueden aparecer tanto en el haz como en el envés; en ambos casos suele observarse un polvillo blanco ceniciento, que puede limitarse a algunas zonas o bien ocupar toda la superficie de la hoja; debajo del polvillo se aprecian puntos necrosados. En los casos de ataque intenso, las hojas aparecen abarquilladas hacia el haz, y recubiertas de polvillo por haz y envés.
- En brotes y sarmientos los síntomas se manifiestan por manchas difusas de color verde oscuro que van creciendo, definiéndose y pasando a tonos achocolatados al avanzar la vegetación, y negros al endurecerse el brote.
- En racimos, al principio los granos aparecen con un cierto tinte plumizo, recubriéndose en poco tiempo del polvillo ceniciento que si se limpia deja ver puntos pardos sobre el hollejo. Los daños más importantes se localizan en los racimos, ya que los ataques fuertes ocasionan la detención del crecimiento de la piel de la baya, por lo que es

¹ También aceptado *Erysiphe necator*.

² Extraído de viticultura.net (véase apartado de Referencias)

frecuente que ésta se agriete y lleguen a rajarse algunos granos; así se producen daños directos en la calidad y cantidad de la cosecha, y otros indirectos al favorecer la penetración del hongo *Botrytis cinerea* y de la podredumbre ácida. Los ataques fuertes provocan también un mal agostado de los sarmientos, con la consecuente disminución de la acumulación de reservas en las yemas.

La forma de invernar del hongo es de dos maneras: sobre hojas y sarmientos en forma de cleistotecas o peritecas, siendo esta su forma sexual; y en forma de micelio dentro de las yemas o sobre ellas, siendo esta su forma asexual y la más peligrosa ya que apenas deja rastros visibles.

El método tradicional de lucha contra el oídio es y ha sido el azufre en polvo. Este método tiene en su favor la eficacia, el bajo coste, sus efectos frenantes de eriófidos y ácaros, y el favorecer el cuajado si se aplica en floración. Como inconvenientes, son necesarias temperaturas superiores a 18°C para que actúe eficazmente, y que puede producir quemaduras si se utiliza con temperaturas superiores a los 30°C. Además, dosis altas pueden disminuir las poblaciones de ácaros fitoseidos, que son enemigos naturales de otras plagas de la vid. A nivel bioquímico actúa inhibiendo la actividad de las mitocondrias. Sólo posee acción de contacto.

Otros tratamientos químicos ya de síntesis (Pérez Marín, 2012) ofrecen mayor número de posibilidades de aplicación y actuación. Los hay inhibidores de la síntesis del ergosterol, como los triazoles y las pirimidinas; interruptores de la cadena de transferencia de electrones y por tanto bloqueadores de la síntesis de ATP, como son las estrobilurinas; o interruptores de la vía de señales que controla la secuencia de infección del hongo, como las quinolinas. En cuanto a su modo de actuación los hay penetrantes, sistémicos y de contacto.

Sin embargo, tras muchos años de aplicación de tratamientos químicos contra la lucha de todo tipo de plagas, la tendencia actual pasa por sustituir los productos de síntesis por alternativas más respetuosas con el medio ambiente como es la lucha biológica.

1.2. Bacterias del género *Bacillus* para el control biológico de plagas

Los patógenos de la vid se combaten mediante el empleo de pesticidas y los de naturaleza química son los que tradicionalmente se han venido empleando y han demostrado su utilidad a lo largo de los años. Sin embargo, en la actualidad hay un cambio en la estrategia para la lucha contra los patógenos, principalmente debido al problema de la contaminación medioambiental generada por el uso y abuso de los productos agroquímicos, y de los efectos de los residuos de los pesticidas sobre la salud humana. La normativa y las regulaciones para el empleo de estos productos fitosanitarios es muy abundante (Delgado, 2014) y el Parlamento Europeo ha incorporado los principios del uso sostenible de los pesticidas en la actual normativa (RD 1311/2012). Se ha adoptado la denominada lucha "integrada" contra las plagas, la cual implica el uso racional y sostenible de estos productos agroquímicos. Por otro lado, los investigadores han dirigido sus pasos hacia la búsqueda de alternativas a los pesticidas químicos tradicionales, desarrollando el concepto control biológico y de "biopesticidas", es decir, productos de origen biológico con actividad para el control de plagas y la protección de las plantas (Bourguignon, 2017). Entre estos biopesticidas se encuentran los microorganismos enemigos o antagonistas naturales de los patógenos, que frenan su crecimiento y proliferación.

Según una reciente revisión sobre este tema (Shafi *et al.*, 2017) los mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas para suprimir o erradicar patógenos pueden ser de tres tipos:

- La producción de biomoléculas tóxicas para el patógeno y de enzimas con actividad lítica frente al patógeno.
- Activar los mecanismos de defensa propios de la planta.
- La competición por el espacio, los nutrientes u otro factor necesario para el patógeno.

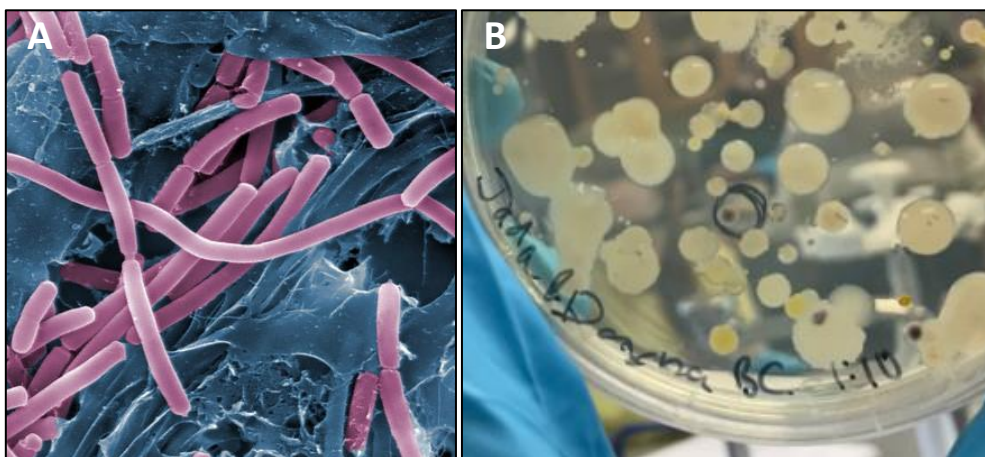


Figura 2. *Bacillus pumilus* (A) y colonias de *B. pumilus* (B)³

Las bacterias del género *Bacillus* son bacterias Gram-positivas, aeróbicas y tienen la ventaja de que se reproducen rápidamente, son resistentes a condiciones ambientales adversas y poseen un espectro amplia actividad frente a patógenos. Además, la administración estadounidense US FDA (*US Food and Drug Administration*) otorgó a la especie *Bacillus subtilis* el status de organismo GRAS (*Generally Recognized As Safe*) para su uso en la industria alimentaria.

Entre las biomoléculas segregadas por especies del género *Bacillus* y con actividad frente a hongos fitopatógenos se encuentran: lipopéptidos, péptidos cíclicos y macrolactonas (Shafi *et al.*, 2017). En estos casos el mecanismo de la acción antifúngica parece ser el bloqueo y la formación de poros en la pared y en las membranas celulares del hongo que provocan la pérdida del material celular y la consecuente muerte del patógeno. De forma similar, cepas del género *Bacillus* producen enzimas, tales como la quitinasa o la beta-1,3-glucanasa, que poseen una fuerte actividad lítica de las paredes celulares de los hongos, y enzimas oxidativas que inducen la formación de lignina, de compuestos fenólicos y cambios estructurales en la planta, que constituyen barreras naturales para la defensa frente a la infección por el hongo fitopatógeno (Shafi *et al.*, 2017).

Además de la actividad antifúngica, los microorganismos del género *Bacillus* también pueden activar el crecimiento de la planta favoreciendo que ésta sintetice hormonas del crecimiento (ácido giberélico y ácido indol-3-acético) y disminuya su producción de etileno. Esta

³ Extraído de blog.coralwonders.com (véase apartado de Referencias)

activación del crecimiento de la planta también puede darse favoreciendo su captación de nutrientes y activando sus mecanismos de defensa frente a factores de estrés, tanto bióticos como abióticos. Estas son bacterias promotoras del crecimiento de la planta.

En algunas ocasiones, cuando un patógeno ataca a una planta, los tejidos no infectados adquieren la capacidad de resistir ataques posteriores del patógeno; a este mecanismo se denomina "resistencia adquirida sistémica" y ciertos microorganismos beneficiosos pueden desencadenar dicha resistencia, denominándose en este caso resistencia sistémica inducida. Los mecanismos implicados en este tipo de resistencia inducida en la planta son: la síntesis en la planta de compuestos fenólicos, modificaciones genéticas y estructurales, activación de genes de resistencia y de enzimas para la defensa contra los patógenos. Las rizobacterias son típicas inductoras de este tipo de resistencia, y cepas de las especies *B. subtilis*, *B. sphaericus* y *B. pumilus* han demostrado esta capacidad inductora de la resistencia sistémica de la planta (Shafi *et al.*, 2017).

En relación a esta especie, *B. pumilus* se encuentra en suelos y asociada de forma natural a raíces, hojas, semillas, tallos, cortezas de distintas especies de plantas, además de encontrarse en otros nichos naturales. Se ha secuenciado el genoma de la cepa *B. pumilus* SCAL1, endofítica, termo-tolerante (temperatura de crecimiento: 30-60 °C) y promotora del crecimiento de plantas (Mukhtar *et al.*, 2018).

Concretamente, la cepa de *B. pumilus* comercializada por BAYER (y en la que se basa este trabajo) es llamada QST 2808, y es una bacteria cuyos nichos naturales son el suelo, aguas y otros medioambientes. Fue registrada en 2004 como biopesticida autorizado por la Agencia Estadounidense de Protección Medioambiental (EPA) y su Oficina de Programas de Pesticidas (EPA, 2004) para su uso en el control biológico de hongos patógenos de cultivos diversos, especialmente el mildiu, así como para el tratamiento de robles (*Quercus*) y otros árboles, para evitar el síndrome de muerte súbita del roble. Se indica que no es una cepa tóxica ni patogénica para mamíferos ni para otros organismos. Su mecanismo de acción es evitar la germinación de las esporas del hongo fitopatógeno en las plantas de los cultivos al formar una barrera física entre las esporas y la superficie de las hojas de la planta; además la cepa *B. pumilus* QST 2808 es capaz de colonizar las esporas del hongo fitopatógeno. Existen además evidencias de que la cepa puede inducir la resistencia sistémica de la planta, haciéndola más resistente a numerosos patógenos (EPA, 2004).

1.3. Levaduras y fermentación espontánea

Las levaduras son hongos superiores unicelulares microscópicos, que se reproducen por gemación o escisión. Constituyen un grupo taxonómico complejo y heterogéneo, que ha estado sujeto a diversas clasificaciones. La unidad más importante en la taxonomía microbiana es la especie, que es un conjunto de microorganismos que comparten numerosas propiedades morfológicas, fisiológicas y genéticas y que difieren de forma significativa de otras especies.

Aunque dentro del orden de los *Saccharomycetales* se conozcan más de 100 géneros distintos, las levaduras enológicas que se encuentran presentes de manera significativa en la uva y el vino interviniendo en el proceso fermentativo, o que son capaces de desarrollar enfermedades, están representadas por algo más de una quincena de géneros: *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Torulaspora*, *Rhodothorula*,

Metschnikowia, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*. Sin embargo, salvo excepciones, en los mostos en fermentación las cepas predominantes pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, levadura de gran pureza fermentativa y típicamente alcohógena.

La explicación de por qué un tratamiento antifúngico a la uva puede afectar a las fermentaciones, radica en que la inoculación del mosto se produce de forma espontánea por la microbiota presente en el hollejo de la uva y en las superficies de la bodega. Dicha microbiota puede verse afectada por un gran número de factores, entre los que cabe destacar la temperatura, la pluviosidad, la latitud y otras condiciones climáticas, la variedad, el grado de madurez de la uva, o la aplicación de ciertos tratamientos.

En la bodega, las levaduras están fijadas sobre suelos, paredes, depósitos, conducciones y maquinaria de procesado. La microbiota de la bodega, está formada mayoritariamente por *S. cerevisiae*, aunque algunos estudios han demostrado la presencia de no-*Saccharomyces* sobre sus superficies, llegando a ser mayoritarias en ciertas zonas de la misma (Santamaría *et al.*, 2005).

Durante las primeras horas de elaboración se produce una multiplicación de los mismos géneros de levaduras que contiene la vendimia y de los procedentes de su contacto con el material de la bodega. Así, la fermentación se inicia por el crecimiento de varias especies de *Kloeckera*, *Hanseniaspora* y *Candida*, y en menor grado también pueden desarrollarse especies de *Hansenula* y *Pichia*. Su crecimiento se limita generalmente a los 2-3 primeros días de fermentación, en los que se alcanzan 3-4 grados de etanol, y transcurrido ese tiempo mueren. Paralelamente, levaduras más alcohógenas de la especie *S. cerevisiae* van poblando el medio, coexisten inicialmente con las levaduras de la uva, se van convirtiendo en dominantes y conducen el proceso hasta el final, siendo las responsables últimas de la fermentación alcohólica. La desaparición de las cepas no-*Saccharomyces* se debe a la presencia de algunos factores selectivos como: anaerobiosis, presencia de SO₂, elevada concentración de azúcares, y a la creciente presencia de etanol, producido principalmente por *Saccharomyces*. A densidades inferiores a 1070-1060 g/L, en la mayor parte de las vinificaciones, sólo se aíslan levaduras *S. cerevisiae* que llegan a alcanzar durante la fermentación 10⁶-10⁸ ufc/mL. Las características de *S. cerevisiae*, que permiten su imposición en el medio, son su tolerancia a concentraciones de etanol y a más altas temperaturas que otras levaduras (Santamaría, 2009).

S. cerevisiae presenta una gran diversidad clonal y comprende un gran número de cepas con propiedades tecnológicas muy variables. Durante el curso de una fermentación pueden actuar diferentes cepas o clones de *S. cerevisiae*. En este estudio se determinará cómo un tratamiento antifúngico afecta a esta diversidad clonal de *S. cerevisiae*.

Aunque es posible identificar levaduras a nivel de especie mediante métodos tradicionales morfológicos o fisiológicos, son necesarias técnicas más modernas para poder trabajar a nivel de clon, en las que se analiza el genoma de la levadura. Las técnicas utilizadas en este estudio, que se detallarán más adelante, son el análisis de restricción del DNA mitocondrial y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

1.4. Bacterias lácticas

Son microorganismos procariotas, que se diferencian de las levaduras por su pequeño tamaño y la ausencia de membrana nuclear que forme un verdadero núcleo. Además, son un grupo de bacterias con las siguientes características comunes: tienen forma de cocos o bacilos, Gram-positivas, catalasa negativas, inmóviles, no esporuladas, anaerobias pero aerotolerantes y producen ácido láctico como metabolito mayoritario de la fermentación de azúcares. Su papel en el campo de la enología es controvertido: por un lado ejercen un papel beneficioso cuando se quiere que realicen la fermentación maloláctica pero también pueden producir alteraciones que provocan la pérdida de calidad del vino.

Las bacterias lácticas están presentes en todos los mostos de uva y en los vinos. Según el estado de elaboración del vino, las condiciones del medio permiten o no su multiplicación. Cuando se desarrollan, metabolizan numerosos sustratos y ello conlleva un cambio en la composición del vino, pero a su vez, la composición del vino va seleccionando las especies y las cepas o clones mejor adaptados. En el plano de su organización celular todas las cepas se asemejan; es en el plano fisiológico en el que difieren. Las diferencias genéticas y bioquímicas permiten establecer su clasificación.

Los géneros que se pueden encontrar en la uva y el vino son: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus* (Hidalgo, 2010). En cuanto a diversidad clonal, la secuencia del DNA de las cepas es estrictamente específica. No está sometida a las condiciones de cultivo. La identificación de una cepa por el análisis de su genoma aparece entonces como fiable. (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). Existen muchos tipos de análisis que permiten acceder a diferentes niveles de identificación, género, especie, cepa, y los utilizados en este estudio se detallarán más adelante.

CAPÍTULO 2.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

*Conocer el efecto de la aplicación del tratamiento biológico antioídico “Sonata” (*Bacillus pumilus*) sobre el desarrollo de las fermentaciones espontáneas y la calidad de la uva y el vino obtenidos.*

Objetivos específicos:

Atendiendo al planteamiento general, se pretende:

- Conocer si la aplicación del nuevo producto tiene influencia en el desarrollo de las fermentaciones alcohólica y maloláctica.
- Estudiar la influencia del tratamiento en las características enológicas de los mostos y de los vinos elaborados.

En cuanto a microbiología se refiere:

- Estudiar la ecología de las levaduras que llevan a cabo la fermentación alcohólica espontánea:
 - Detectar la presencia de levaduras de diferentes especies en las fermentación alcohólica espontánea.
 - Conocer el nivel de diversidad clonal de las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* en fermentaciones espontáneas.
 - Analizar la incidencia del tratamiento con *Bacillus pumilus* en la ecología de la fermentación alcohólica espontánea.
- Estudiar la ecología de las bacterias lácticas que llevan a cabo la fermentación maloláctica:
 - Conocer el nivel de diversidad clonal de bacterias de la especie *Oenococcus oeni* en las fermentaciones malolácticas espontáneas.

CAPÍTULO 3.

Materiales y métodos

3.1. Diseño experimental

A continuación se detalla brevemente el diseño experimental íntegro del proyecto global desde el viñedo hasta la bodega, así como las condiciones a las que se han visto sometidas las muestras durante todo el proceso (Datos facilitados por el ICVV).

El proyecto se llevó a cabo en 2018 en una parcela de viñedo, en plena producción, localizada en la localidad de Nájera (La Rioja). Responde al perfil medio del cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.) en el ámbito de la D.O.Ca. Rioja, con la variedad Tempranillo, plantada en 1984. El sistema de conducción corresponde a un cultivo en vaso y un marco de plantación de 1,35 x 2,55 m; lo que resulta una densidad de plantación de 2.905 cepas/ha. El cultivo se mantiene en régimen de riego por goteo. Véase Anexo I.

En la parcela se realizó un diseño experimental de bloques al azar con cuatro repeticiones por tratamiento (8 subunidades/parcela). La media de cepas por repetición fue de 34, por lo que se contó con un total de 268 cepas. En estas 8 subunidades, se tomaron muestras durante la maduración para determinar el momento óptimo de la vendimia, y se valoró el rendimiento en cada una de ellas. Asimismo, cada repetición se vendimió y vinificó por separado.

Todas las subunidades fueron mantenidas de igual forma, en lo que respecta a prácticas agronómicas y defensa fitosanitaria.

Con este planteamiento, se consideraron los siguientes tratamientos experimentales, aplicados por la empresa en cinco momentos, tras el cuajado. (Anexo I)

- **Tratamiento 1 (Testigo):** tratamiento tradicional con azufre “Elosal GD®” (azufre 80%), 4 kg/Ha.
- **Tratamiento 2 (Sonata):** tratamiento con el nuevo producto “SONATA® ASO”, 5 L/Ha después del cuajado.

En la parcela de viñedo considerada para este estudio se realizaron también tratamientos convencionales antes de la floración con productos sistémicos antioídio, así como antimildiu y antibotrícos, realizándose en total un mayor número de tratamientos que los habituales debido a las complicaciones climáticas de la campaña. (Anexo I. Régimen hídrico y térmico).

Para estimar la fecha de vendimia, en diferentes momentos del proceso de maduración, se muestrearon 200 bayas por cada tratamiento y repetición, en las que se evaluó el peso de 100 bayas, la concentración de azúcares y el pH.

En el momento de la vendimia se analizaron los parámetros de calidad de la uva y del mosto que se indican a continuación:

- Peso de 100 bayas (g)
- Concentración de azúcares, expresado como Grado alcohólico probable (Refractometría)
- pH (pH-metro digital)
- Acidez total (g/L de ácido tartárico, Reglamento, C. E. E. 2676/90)
- Ácido málico (g/L) (Determinación enzimática, Reglamento, C. E. E. 2676/90)
- Ácido tartárico (g/L) Método de Rebelein (Ough, 2012)
- Ácido glucónico (g/L) (Determinación enzimática)

- Potasio (mg/L) (Espectroscopía de emisión atómica)
- Intensidad de color: Abs 420 nm + Abs 520 + Abs 620 nm

La determinación de la concentración de azúcares, pH, acidez total, ácidos málico, tartárico y glucónico, potasio e intensidad de color se realizaron sobre el mosto obtenido después de triturar, filtrar y centrifugar 300 bayas de uva.

Una vez realizada la vendimia, se procedió a vinificar cada tratamiento y repetición de forma individualizada. Las elaboraciones se llevaron a cabo en la bodega experimental del ICVV, en depósitos de acero inoxidable de 100 litros, que después del estrujado, despalillado y sulfitado se mantuvieron a temperatura ambiente para llevar a cabo la fermentación alcohólica (FA) espontánea, sin siembra de levaduras. Se controló la cinética de fermentación mediante determinación del descenso de la densidad, como medida del consumo de azúcares, y recuento del número de levaduras viables.

Asimismo, en el momento de FA tumultuosa (densidad en torno a 1025 g/L) se evaluó la distribución clonal de la población de *Saccharomyces cerevisiae* que llevó a cabo la FA, mediante al análisis de restricción de su DNA mitocondrial. Diariamente se procedió al bazuqueo de los depósitos, que se prensaron cuando alcanzaron una densidad de 1000 g/L. Una vez finalizada la FA (contenido en azúcares inferior a 3 g/L), se trasegaron a depósitos de 50 litros que no se inocularon con bacterias lácticas para permitir que la FML se desarrollara de forma espontánea, a una temperatura de 19°C. Su evolución se controló mediante determinación periódica del contenido de ácido málico. Al final de la misma (contenido en ácido málico inferior a 0.2 g/L), de nuevo se tomaron muestras para el análisis de los siguientes parámetros: grado alcohólico (% v/v), pH, acidez total (g/l de ácido tartárico), ácidos tartárico, málico y láctico (g/L), acidez volátil (g/L ácido acético), azúcares reductores (g/L) y sulfuroso libre y total (mg/L).

3.2. Métodos de identificación de levaduras

La toma de muestra tuvo lugar en fermentación alcohólica tumultuosa, a densidad aproximada de 1025 g/L. Se realizó siembra mediante diluciones decimales seriadas para los recuentos de levaduras y se seleccionaron 10 colonias de cada placa procedente de cada depósito, que se reislaron en el medio de cultivo CGA (composición indicada en el Anexo III) y se conservaron hasta el momento del análisis del DNA mitocondrial para estudiar la diversidad clonal.

3.2.1. Métodos de identificación de clones de *Saccharomyces cerevisiae*

En la realización de este estudio en concreto, se identificó cada una de las colonias aisladas mediante técnicas de biología molecular. Se utilizó el análisis de restricción del DNAm para diferenciar entre levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* y para la identificación de clones de *S. cerevisiae*, mediante determinación de su perfil genético.

Análisis de restricción del DNA mitocondrial. (Santamaría, 2009; según el método de Querol *et al.*, 1992)

El DNAm_t de *S. cerevisiae* es una pequeña molécula de 60-80 kb que posee un marcado polimorfismo, que se pone de manifiesto al analizar los perfiles de restricción. El análisis de la variabilidad que revela este molécula es uno de los más aplicados en la caracterización de cepas vínicas de *S. cerevisiae*.

El DNAm_t de las levaduras es una molécula con un 75% de adenina (A) y timina (T), que también posee unas 200 regiones ricas citosina (C) y guanina (G). Por tanto, al realizar una digestión del DNA total de la levadura con enzimas de restricción del tipo G₁C₁A₁T₁, estos no reconocen ni las secuencias ricas en GC ni en AT. Dado el bajo número puntos de corte del DNAm_t y el elevado número de puntos de restricción del DNA nuclear, el primero se rompe en pocos fragmentos de gran tamaño, que se visualizan claramente mediante electroforesis como bandas bien definidas, bien diferenciadas de la sombra de degradación formada por los pequeños y numerosos fragmentos del DNA nuclear.

Preparación de la muestra. Cada colonia aislada se creció en 5 mL de medio YPD (Anexo III) a 28°C durante toda la noche y en agitación para partir de un cultivo joven.

Extracción del DNA. El cultivo se recogió por centrifugaciones sucesivas en tubos eppendorf, se lavó con agua estéril y se resuspendió en 0.5 ml de la solución de sorbitol (Solución 1, Anexo III). Se añadieron 40 µL de una solución de Zymoliasa, para romper las paredes celulares, dejándolo incubar a 37°C durante 60 min. Los protoplastos obtenidos se recogieron mediante centrifugación, se resuspendieron en una solución de Tris-HCl 1 M/EDTA 0,5 M (Solución 2, Anexo III), se añadieron 50 µL de SDS 10% y se dejaron en reposo durante 30 min a 65°C.

Posteriormente, se añadieron 200 µL de acetato potásico 5 M y se colocaron los tubos en un baño de hielo durante 30 min para precipitar las proteínas, que se recogieron mediante centrifugación. El sobrenadante se vertió en un tubo eppendorf y se volvió a repetir la operación dejándolo en reposo en baño de hielo otros 15 min. La precipitación del DNA se realizó añadiendo 700 µL de isopropanol al sobrenadante y dejándolo en reposo a temperatura ambiente durante 10 min. El sedimento de DNA se lavó con 500 µL de etanol al 70%, se centrifugó y se secó a vacío. Finalmente, el DNA se resuspendió en 30 µL de tampón TE.

Análisis de restricción del DNAm_t. Del DNA obtenido en el apartado anterior se digirieron 10 µl con el enzima de restricción *AluI*. Se utilizó este enzima en lugar de otras que aparecen en la bibliografía (*DdeI*, *HinfI*, *RsaI*), porque en trabajos anteriores resultó ser el que mayor poder de discriminación presentó con cepas autóctonas de la D.O.Ca. Rioja (Gutiérrez, 1994). El enzima de restricción se utilizó usando el tampón e instrucciones del proveedor. La digestión se realizó a 37 °C durante 14-16 h.

Separación de los fragmentos de DNAm_t. Los fragmentos de restricción se separaron mediante electroforesis horizontal (Biorad DNA sub cell) en geles de agarosa al 1%, en tampón TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 0.5 M, pH 8). Para analizar los fragmentos, los geles se sumergieron en una solución de bromuro de etidio (2 µg/mL) donde se mantuvieron durante 15 min y se visualizaron en un transiluminador ultravioleta. El marcador de peso molecular utilizado en todos los geles fue el DNA del fago λ digerido con *HindIII*.

Identificación y comparación de clones de *Saccharomyces cerevisiae*.

El análisis del DNAm de las colonias de *Saccharomyces cerevisiae* permitió obtener el patrón de restricción de cada una de ellas. Asumiendo que cada patrón es representativo de una cepa, puede establecerse que patrones iguales proporcionados por diferentes colonias, corresponderán a levaduras iguales, pertenecientes al mismo clon. La digestión del DNAm de *Saccharomyces cerevisiae* obtenido con la enzima *AluI*, dio lugar a un patrón de restricción formado por 5 o 6 bandas. El fragmento de mayor peso molecular (primera banda, Figura 7) es característico de la especie, mientras que en el resto es donde se encontró la variabilidad intraespecífica que permitió la identificación clonal. La variabilidad mostrada por los patrones de restricción en los fragmentos inferiores a 2500 pb, también se utilizó en la identificación y comparación clonal, siempre y cuando lo permitió su resolución. Por ello, se hizo necesario comparar los patrones de restricción obtenidos: entre las muestras de vino procedentes de las uvas testigo y de las de uvas tratadas con Sonata. Todo ello permitió estudiar cómo afecta el tratamiento realizado en viñedo sobre la variabilidad clonal (intraespecífica) y variedad de especies (interespecífica) de las levaduras.

Determinación del índice de diversidad.

Se determinó la variabilidad clonal de cada fermentación mediante el índice de diversidad (ID) (Bert *et al.*, 1997; López, 2004):

$$ID = 1 - \frac{\sum n_j(n_j - 1)}{N(N - 1)}$$

Donde:

- N.- número total de cepas *Saccharomyces*
- n_j - número de cepas *Saccharomyces* con el mismo patrón electroforético

Este índice se calculó en cada fermentación teniendo en cuenta únicamente los diferentes clones *Saccharomyces* identificados en fase tumultuosa, para obtener un valor objetivo de la diversidad clonal.

3.2.2. Métodos de identificación de levaduras del tipo *no-Saccharomyces*

Extracción de DNA genómico amplificable por PCR.

La extracción de DNA se realizó a partir de un cultivo fresco empleando el método propuesto por López (2004). La cantidad de DNA necesaria para llevar a cabo una reacción de PCR es mínima, por lo que para dicha técnica se utilizó un protocolo de extracción rápido. A partir de un cultivo puro en placa de 48 h se recogió un asa de siembra y se resuspendió en 250 μ L de tampón de lisis (Tris 50 mM, pH 8; β -mercaptoetanol 10 mM) en un eppendorf. Se agitó con vortex y se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente. Se sometió a 100°C durante 10 min en un baño de agua hirviendo. Se agitó en caliente con vortex y se centrifugó a 13.000 rpm durante 3 min. El sobrenadante, que contiene el DNA genómico, se recogió en un eppendorf estéril y se utilizaron 10 μ L para cada reacción de amplificación por PCR.

Identificación de especies mediante secuenciación del DNA.

Se amplificó mediante PCR el dominio D1/D2 con los cebadores y condiciones descritos por Kurtzman y Robnett (1998) y que se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cebadores y condiciones de la PCR universal de levaduras (Kurtzman y Robnett, 1998)

Cebadores (secuencia 5'→ 3')	Fragmento amplificado (pb)	Condiciones de amplificación		
NL1 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	580	94°C	3 min	1 ciclo
NL4 GGTCCGTGTTTCAAGACGG		94°C	1 min	
		52°C	45 s	36 ciclos
		72°C	2 min	
		72°C	4 min	1 ciclo

Esta técnica se basa en el análisis de una pequeña parte de la subunidad 26S del DNAr, el dominio D1/D2, un fragmento constituido por 600 pb, (Figura 3). La región D1/D2 puede considerarse como la “huella digital” para un gran número de especies de Ascomicetos. La mayoría pueden ser identificados en base a las diferencias existentes en este dominio (Kurtzman y Robnett, 1998).

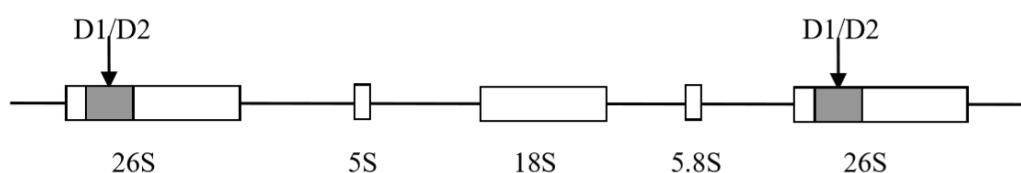


Figura 3. Esquema del dominio D1/D2⁴

Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron por MacroGen, para determinar el género y especie de levadura. Las secuencias resultantes se enfrentaron a la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para determinar la especie de levadura a la que pertenecía cada colonia aislada.

3.3. Métodos de identificación de bacterias lácticas

Al final de la fermentación maloláctica (contenido en ácido málico inferior a 0.2 g/L) se tomaron muestras de cada depósito para analizar su microbiota. Se realizó la siembra de las muestras de vino en placas Petri con medio MRS-agar (Anexo III) al que se añadió pimarcina (50mg/L) para impedir el crecimiento de levaduras. Las placas se incubaron en anaerobiosis a 30°C durante 10 días para evitar el posible crecimiento de bacterias acéticas y favorecer el crecimiento de bacterias lácticas. De cada placa se aislaron cinco colonias representativas de cada muestra de vino y se realizó el análisis por PCR (RAPDs) directa de colonia.

⁴ Tomado de Garijo 2013 (véase sección de Referencias)

3.3.1. Métodos de identificación de clones de *Oenococcus oeni*

Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPDs)

Es un proceso basado en la PCR. Los fragmentos de DNA obtenidos por medio de esta técnica se amplifican en regiones aleatorias del genoma ya que los cebadores de la reacción son oligonucleótidos con secuencias arbitrarias de DNA. Se aislaron 5 colonias de las placas donde la población se encuentre entre 30 y 300 ufc/mL. A las 48 h de incubación se puede hacer PCR directa de colonia.

Primero se resuspende una colonia aislada en 10 µL de agua PPI o ultrapura y se prepara el pool de PCR: 5µL Buffer (sin MgCl₂) 10x; 3,5 µL de MgCl₂ 50mM; 1 µL dNTP 50 mM (12,5 de cada una); 1 µL M13 (primer) 100µM; 0,4 µL BIOTAQ DNA pol 5U/µL; 37, 1 µL agua. Se distribuyen 48µL del pool de PCR en cada tubo y se añaden 2µL de la suspensión de cada colonia. Si se hace extracción de DNA, se añaden 5µL. Previamente se cuantifica y consigue concentración de 3 ng/µL.

El programa de PCR es el siguiente:

2 ciclos: 94°C(40s)-45°C(1min)-72°C(3min)

30 ciclos: 94°C(40s)-52°C(1min)-72°C(3min)

2 ciclos: 70°C(5min)

Se prepara el gel de agarosa al 1,4% p/v en TBE 0,5X. Se cargan 20µL del producto de PCR. Se utiliza marcador de 50 pb. (3µL)

Se corre la electroforesis a 70V 2h, y se tiñe con bromuro de etidio al 10% con TBE 0,5X preparado nuevo.

CAPÍTULO 4.

Resultados y discusión

4.1. Desarrollo de las fermentaciones

4.1.1. Desarrollo de la fermentación alcohólica

La cinética de la fermentación alcohólica se estudió mediante determinación diaria de la densidad y recuento de levaduras viables. Como se observa en la siguiente figura, la velocidad de fermentación no se vio afectada por el tratamiento con el nuevo producto, siendo su duración media en los dos casos de 12 días. Las posibles variaciones entre ambas vinificaciones entran dentro del rango de sus desviaciones estándar (Figura 4)

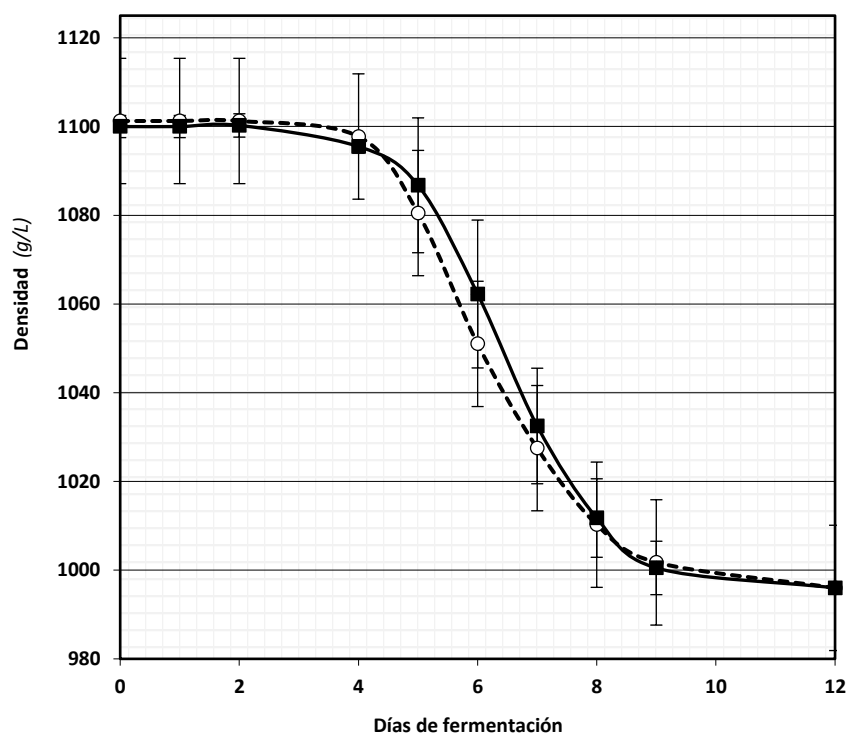


Figura 4. Comparación de la evolución de la densidad del mosto durante la fermentación alcohólica. Los datos se corresponden con las medias observadas para las muestras tratadas con SONATA (—■—) y las muestras testigo (---○---), con sus desviaciones estándar⁵

Las respectivas tablas, con los datos facilitados por el ICVV se muestran en el Anexo II.

⁵ Véase Tabla 9 en Anexo II.

En lo que respecta al recuento de levaduras viables, no hubo diferencias entre los tratamientos, lo que muestra que el producto biológico no fue perjudicial en cuanto al desarrollo de estos microorganismos responsables de la transformación del azúcar del mosto en etanol. Una vez más las posibles oscilaciones entran dentro de la variabilidad, representada con las barras de la desviación estándar (Figura 5).

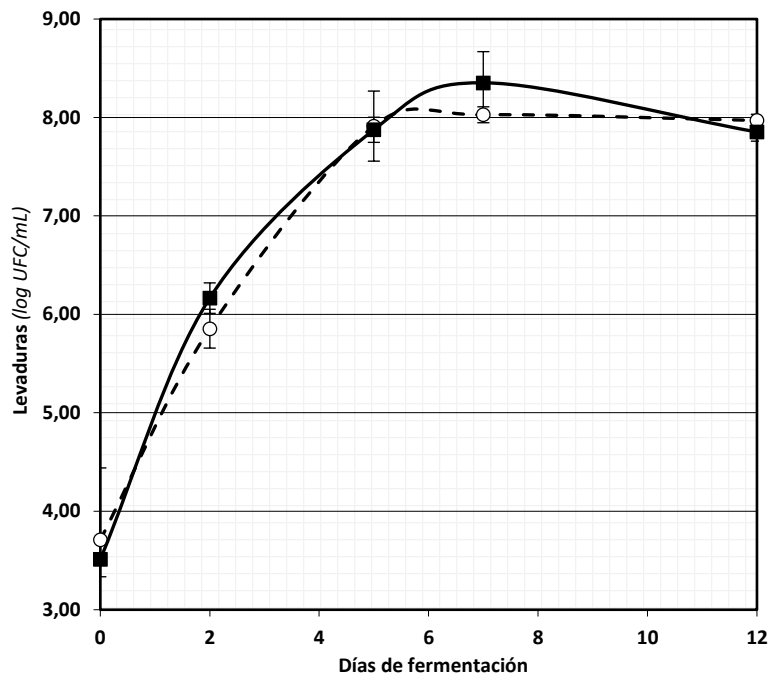


Figura 5. Comparación de la evolución de la población de levaduras en el mosto durante la fermentación alcohólica. Los datos se corresponden con las medias observadas para las muestras tratadas con SONATA (—■—) y las muestras testigo (---○---), con sus desviaciones estándar.⁶

Las respectivas tablas, con los datos facilitados por el ICVV, se muestran en el Anexo II.

⁶ Véase Tabla 9 en Anexo II.

4.1.2. Desarrollo de la fermentación maloláctica

La evolución media del contenido en ácido málico durante la fermentación maloláctica se muestra en la Figura 6, en la que se observa que fue seis días más rápida en los vinos cuyas uvas se habían tratado con el producto biológico que en el caso del testigo.

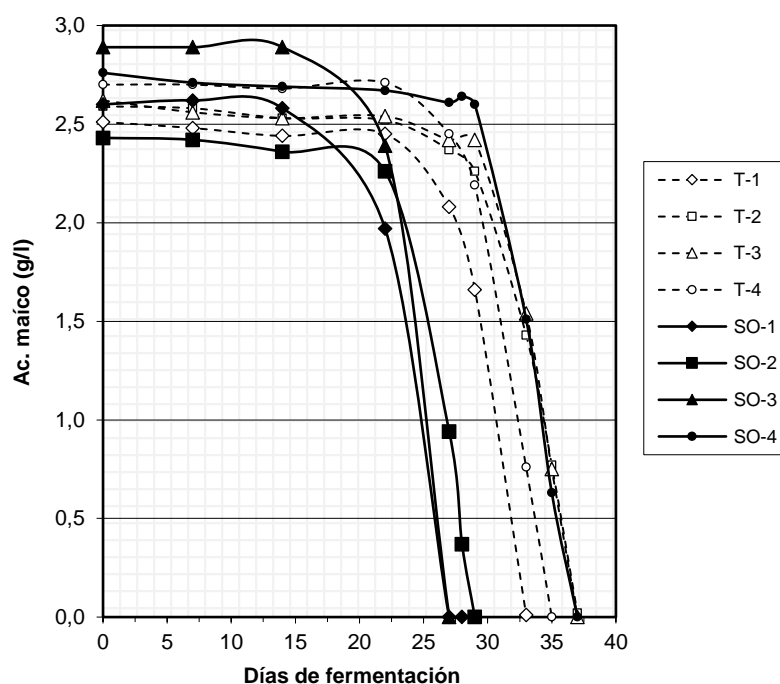


Figura 6. Comparación de la degradación del ácido málico en el vino durante la fermentación. Los datos se corresponden con los valores obtenidos para las muestras tratadas con SONATA (—) y las muestras testigo (- -).⁷

Esta mayor variabilidad no es debida a errores instrumentales ni de medición, sino que al tratarse de vinificaciones diferentes, cada una lleva una evolución propia de la fermentación. Se ve reflejado el mismo hecho que en bodega, que no todos los depósitos llevan la fermentación maloláctica de igual manera, y no todos terminan a la vez. La Figura 6 muestra que hay mayor heterogeneidad en el transcurso de las fermentaciones malolácticas para los vinos procedentes de las uvas tratadas con el producto biológico que para los vinos testigo. Para mayor información acerca del transcurso de las fermentaciones de cada depósito, véase Anexo II.

⁷ Véase Tabla 10 en Anexo II.

Para la fermentación maloláctica no se consideró realizar un seguimiento de la evolución de la población de bacterias dado que se trata de un proceso mucho más dilatado en el tiempo y proporcionaría poca información acerca del mismo.

4.2. Caracterización clonal

4.2.1. Caracterización clonal de levaduras en fermentación alcohólica

El análisis a nivel clonal de las cepas de levaduras aisladas de la fermentación alcohólica tumultuosa (a densidad de 1025 g/L), muestra que para las 4 repeticiones del vino obtenido de la parcela sin tratamiento (testigo), no hay variabilidad intraespecífica, es decir, variabilidad clonal para *Saccharomyces cerevisiae*. (véase Tabla 2) Se observan sin embargo 6 colonias de levaduras de tipo *no-Saccharomyces* sobre las que se hablará más adelante.

Tabla 2. Diversidad clonal de *S. cerevisiae* en FA tumultuosa (densidad aproximada 1025 g·L⁻¹) en vino procedente de la parcela testigo. Cada patrón de bandas idéntico (correspondiente a un clon distinto) se nombra con el mismo número romano.

Nº colonia	Testigo 1	Testigo 2	Testigo 3	Testigo 4
1				
2				
3				
4	N.S.			
5				N.S.
6				N.S.
7				
8				
9	N.S.		N.S.	
10	N.S.			

N.S.: Levaduras de tipo *no-Saccharomyces*.

El análisis para los vinos tratados con el antioídio muestra una mayor variabilidad tanto intraespecífica para *S. cerevisiae* como interespecífica con otras especies de tipo *no-Saccharomyces*. Resultan un total de 5 clones diferentes de *S. cerevisiae* (Tabla 3) y un total de 13 colonias de especies de tipo *no-Saccharomyces*.

Índice de diversidad clonal

Al tratarse únicamente de un solo clon, el índice de diversidad clonal anteriormente expuesto es lógico que tenga un valor de 0.

Tabla 3. Diversidad clonal de *S. Cerevisiae* en FA tumultuosa (densidad aproximada 1025 g·L⁻¹) en vino procedente de la parcela tratada. Cada patrón de bandas idéntico (correspondiente a un clon distinto) se nombra con el mismo número romano.

Nº colonia	Sonata 1	Sonata 2	Sonata 3	Sonata 4
1	I	N.S.	N.S.	N.S.
2	I	I	I	N.S.
3	I	II	I	N.S.
4	I	II	IV	N.S.
5	I	I	N.S.	N.S.
6	N.S.	I	I	I
7	I	III	I	N.S.
8	I	I	N.S.	I
9	N.S.	I	I	V
10	I	I	N.S.	I

N.S.: Levaduras de tipo *no-Saccharomyces*.

En la Figura 7 se detallan los perfiles electroforéticos obtenidos para cada uno de los clones diferentes de *S. cerevisiae*. Se muestra también el fago λ como marcador. Además, como se puede observar en la figura, el perfil I se corresponde con la levadura comercial que es utilizada habitualmente para inocular los mostos en la bodega del ICVV (Uvaferm VRB). Este clon de levadura ha colonizado por completo los mostos testigo, y en el caso del tratamiento con Sonata, aunque se encontró una mayor variabilidad clonal, el perfil mayoritario coincidió también con el de la levadura comercial Uvaferm VRB. Este hecho puede ser debido a la utilización de dicha levadura en otras fermentaciones que se estaban llevando a cabo en la bodega y que existen intercambios de microorganismos a través del aire y las instalaciones. (Garijo, 2013)

Índice de diversidad clonal

En este caso se obtiene un índice de diversidad clonal de 0,339. Se trata de un valor que oscila entre 0 y 1, y que da idea de la variabilidad de clones dentro de una misma especie. Aunque hay fermentaciones con índices mucho mayores (Santamaría, 2009) representa una diferencia considerable respecto a la elaboración testigo.

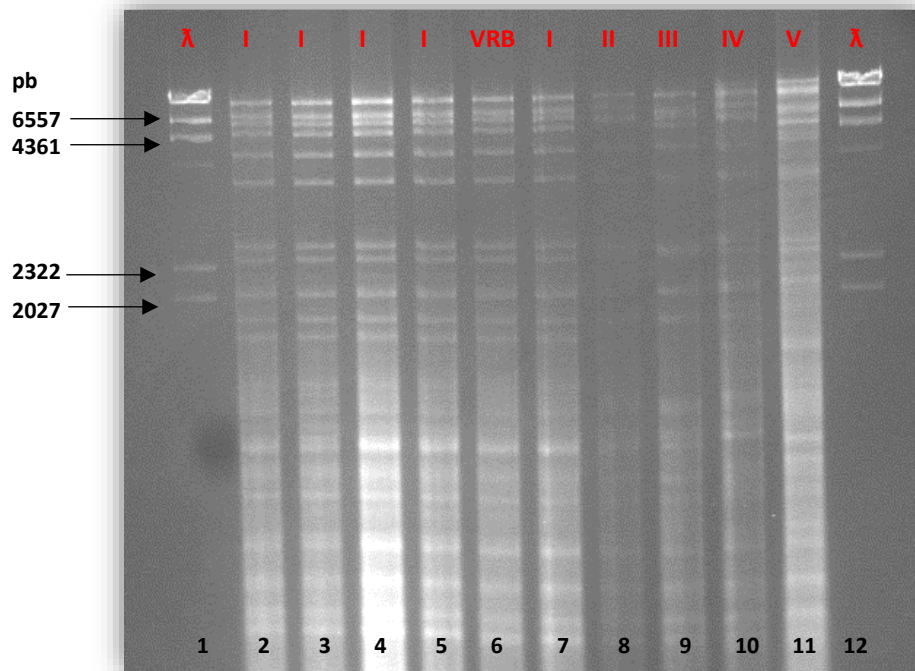


Figura 7 . Perfiles electroforéticos obtenidos mediante el análisis de restricción del DNA mitocondrial. Marcador de pesos moleculares: fago λ -digerido con la enzima Hind III: Pocillos 1 y 12. Aislados de los vinos testigo: pocillos 2,3,4,5. Levadura comercial VRB: pocillo 6. Aislados de los vinos tratamiento: pocillos 7, 8, 9, 10 y 11.

En la Figura 8 se observa la variabilidad clonal para ambos casos, el vino procedente de uvas tratadas con Sonata y el vino procedente de uva sin tratar.

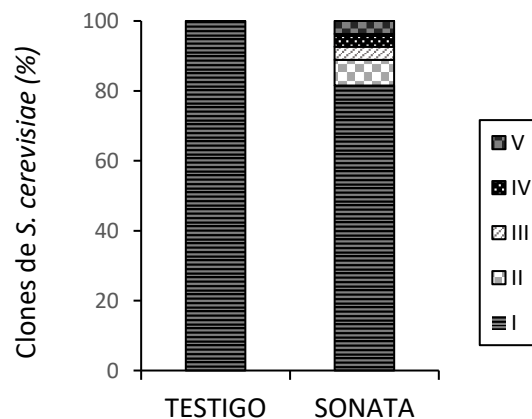


Figura 8 . Variabilidad clonal dentro de la especie *S. cerevisiae* dentro de los vinos testigo (TESTIGO) y tratamiento con el antióxido (SONATA)

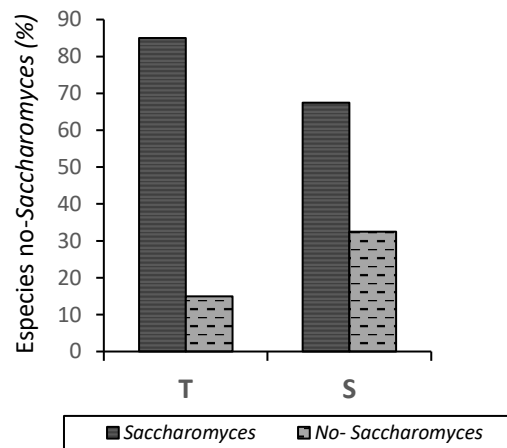


Figura 9. Comparación en porcentajes de las colonias de *S. cerevisiae* y de levaduras no-*Saccharomyces* para el vino testigo (T) y el procedente del tratamiento (S)

En cuanto a la población de no-*Saccharomyces* se observa un mayor porcentaje en las colonias obtenidas a partir del vino procedente de las uvas tratadas con Sonata (Figura 9). Los resultados de la secuenciación, se enfrentaron a la base de datos del NCBI para determinar la especie a la que pertenecía cada colonia. Las especies resultantes fueron *Candida zemplinina* para las elaboraciones testigo; y para las elaboraciones con Sonata se encontró *Hanseniaspora uvarum* y *Rhodotorula nothofagi* además de la primeramente mencionada. En la Figura 10 se muestra la abundancia relativa de cada una de ellas.

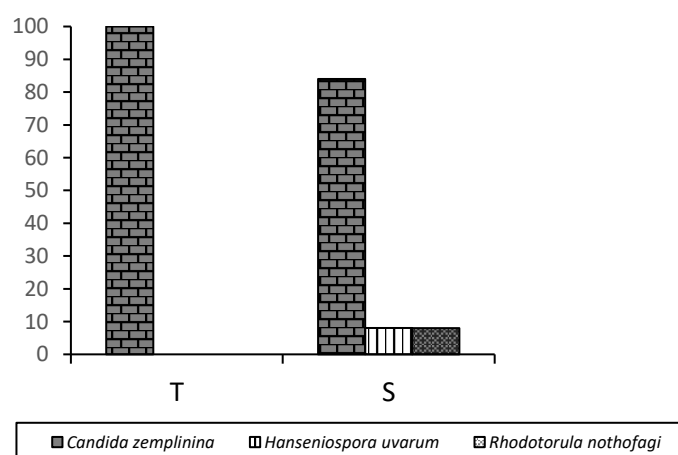


Figura 10. Abundancias relativas de las especies no-*Saccharomyces* en las colonias obtenidas de los vinos testigo (T) y tratamiento (S)

4.2.2. Caracterización clonal de bacterias

La caracterización clonal de las cepas de *Oenococcus oeni* se realiza mediante la técnica de RAPDs ya descrita anteriormente. Las imágenes de los geles de agarosa resultantes se procesan con el programa informático infoQUEST, el cual genera el árbol que asigna y agrupa cada secuencia de DNA a un clon distinto (Figura 11).

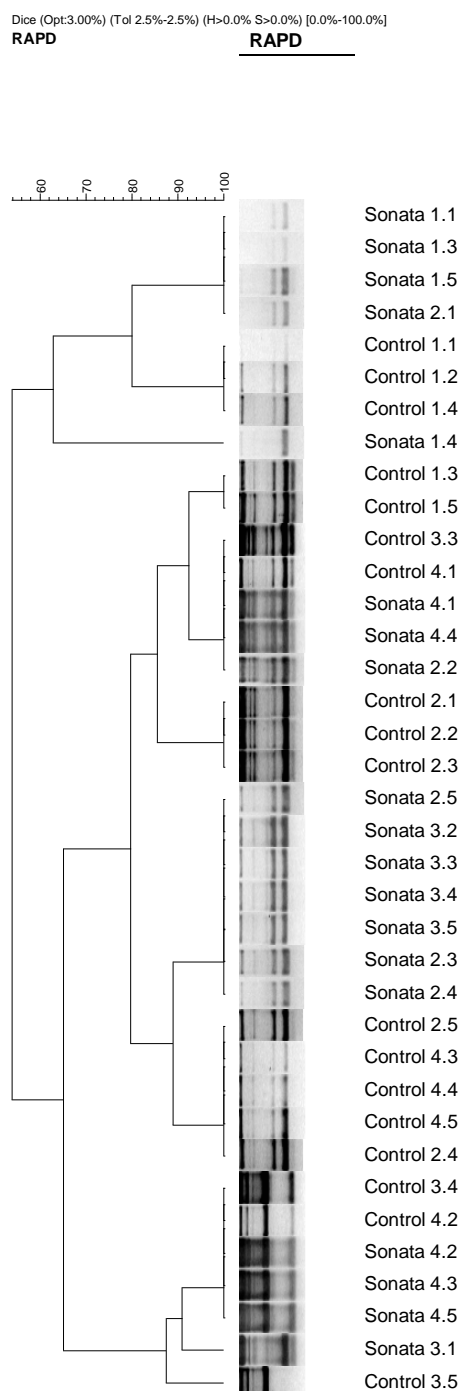


Figura 11. Dendrograma obtenido a partir de la técnica de RAPDs de identificación de clones bacterias *O. oeni*.

A partir de los datos de la Figura 11, se numeran los diferentes tipos de clones tal y como se muestra en la siguiente tabla. Como ya se ha comentado antes, la toma de muestras para las bacterias lácticas se realizó entre el 60% del transcurso de la fermentación maloláctica y el final de la misma.

Tabla 4. Clones de *Oenococcus oeni* en el vino (datos en %) durante la FML.

CLON	Testigo	Sonata
I	17	--
II	28	--
III	17	--
IV	11	--
V	11	16
VI	11	16
VII	5	--
VIII	--	21
IX	--	5
X	--	5
XI	--	37

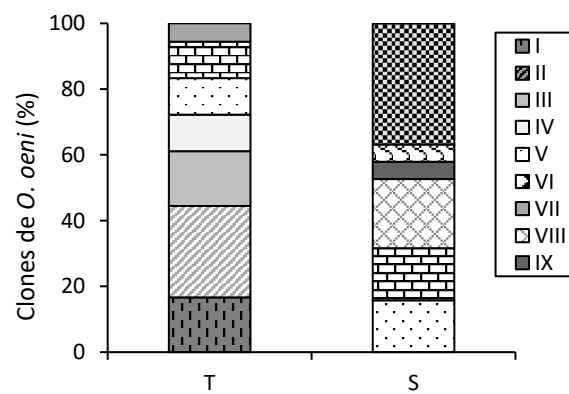


Figura 12. Abundancia relativa de cada clon de *O. oeni* para cada tipo de vinificación.

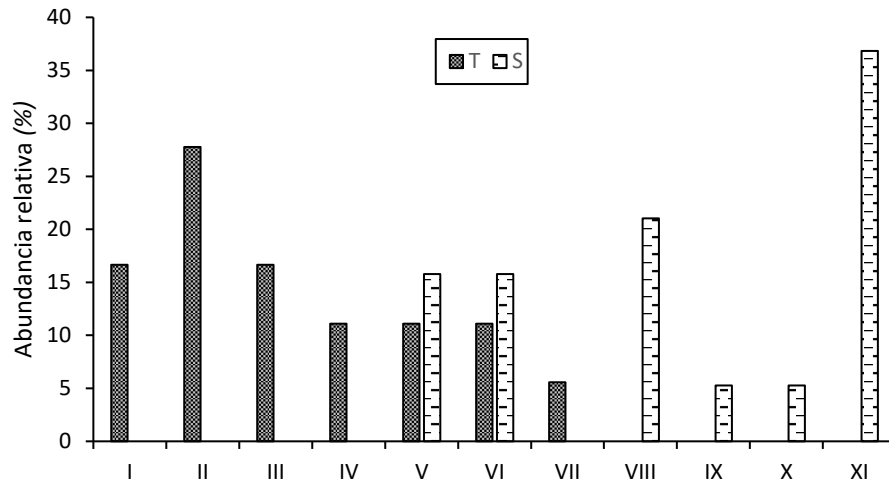


Figura 13. Abundancia relativa de los diferentes clones de *O. oeni* (mostrados con números romanos) para los vinos control (T) y tratamiento con Sonata (S)

El análisis clonal de las bacterias lácticas de *O. oeni* mostró una alta diversidad tanto en los vinos Testigo como en los procedentes del tratamiento con Sonata. Se observa, además, que el tratamiento antioídio aplicado al viñedo influyó en la población de clones de bacterias que intervinieron en la fermentación maloláctica. De los 11 clones observados, sólo 2 son coincidentes para ambos vinos. El resto se encontró en diferentes proporciones, siendo mayoritario el clon con perfil II en las elaboraciones Testigo y el clon XI en las procedentes del tratamiento biológico.

4.3. Resultados de análisis enológicos y de producción de uva

Por último, se realizan comparaciones de medias mediante análisis de varianza con el programa SPSS para los datos facilitados por el ICVV en cuanto a cómo afecta el tratamiento a la producción y a los análisis químicos del mosto y vino, así como para observar si hay diferencias significativas en estos aspectos para las series tratadas con Sonata y las series testigo. Todos los análisis de datos se toman con un nivel de confianza del 90% debido a que generalmente los ensayos en campo precisan de un mayor margen de tolerancia que los ensayos en laboratorio, debido a la gran variabilidad que conllevan.

4.3.1. Resultados de la producción de uva

Según los datos facilitados por el ICVV, en el momento de la vendimia (17 de octubre), en la que se vendimiaron un total de 1138 kg de uva, se valoró el rendimiento para cada uno de los tratamientos. En la Tabla 5 se puede observar que, aunque sin diferencias significativas, las cepas tratadas con Sonata tendieron a tener un mayor peso del racimo, a pesar del menor número de racimos por cepa, lo que dio lugar a que el rendimiento por cepa fuera similar.

Tabla 5. Componentes del rendimiento en la parcela experimental (n=4), con el error estándar expresado como $\pm 2s$. (Tabla 11 en Anexo II)

Tratamiento	Rendimiento (kg/cepa)	Número racimos/cepa	Peso medio del racimo (g)
Testigo	4,27 \pm 1,60	11,0 \pm 3,7	391 \pm 26
Sonata	4,23 \pm 1,70	10,2 \pm 3,6	411 \pm 34

4.3.2. Análisis de datos enológicos del mosto

El control de maduración llevado a cabo en las uvas para determinar el momento óptimo de la vendimia indicó que tanto el peso, como el pH y el grado alcohólico probable siguieron las pautas habituales durante el proceso de maduración, aumentando hasta el momento de la vendimia, que se llevó a cabo el 17 de octubre. Los resultados correspondientes a la composición de la uva en el momento de la vendimia se muestran en la Tabla 6, en la que se puede observar que no se detectaron diferencias significativas para ninguno de los parámetros. Todos ellos estuvieron dentro de los valores habituales en uvas de Tempranillo.

Tabla 6.- Composición de la uva en el momento de la vendimia (n=4). Datos en Tabla 12, Anexo II

Parámetros generales	Testigo	Sonata
Peso 100 bayas (gr)	261 \pm 9 a	258 \pm 13 a
Grado probable (% v/v)	13,1 \pm 0,5 a	12,9 \pm 0,4 a
pH	3,56 \pm 0,02 a	3,54 \pm 0,03 a
Acidez total (g/L ác. tartárico)	4,64 \pm 0,19 a	4,84 \pm 0,18 a
Ácido tartárico (g/L)	6,52 \pm 0,17 a	6,67 \pm 0,24 a
Ácido málico (g/L)	2,10 \pm 0,24 a	2,35 \pm 0,16 a
Ácido glucónico (g/L)	0,14 \pm 0,02 a	0,11 \pm 0,04 a
Potasio (mg/L)	1747 \pm 143 a	1853 \pm 136 a
NFA (mg/L N)	132 \pm 9 a	133 \pm 12 a
Antocianos (mg/gr uva)	1,41 a	1,32 a
Polifenoles totales	72,4 a	76,6 a

4.3.3. Análisis de datos enológicos de los vinos

Sólo se encontraron diferencias en el resultado de los parámetros físico-químicos de los vinos después de la FML en la acidez volátil, que fue significativamente mayor en los vinos procedentes de las uvas tratadas con Sonata (Tabla 7) que se podría relacionar con la mayor participación de levaduras no-*Saccharomyces* en la fermentación alcohólica.

Tabla 7.- Composición de los vinos después de la FML (n=4). Datos en Tabla 13, Anexo II

Parámetros generales	Testigo	Sonata
Grado alcohólico (% v/v)	14,0 ± 0,3 a	13,5 ± 0,7 a
Acidez volátil (g/L ácido acético)	0,35 ± 0,01 a	0,66 ± 0,12 b
pH	3,72 ± 0,09 a	3,75 ± 0,09 a
Acidez total (g/L ácido tartárico)	4,54 ± 0,21 a	4,37 ± 0,21 a
Ácido tartárico (g/L)	1,88 ± 0,16 a	1,69 ± 0,14 a
Ácido láctico (g/L)	1,66 ± 0,06 a	1,76 ± 0,15 a
Intensidad de color	6,29 ± 0,22 a	5,96 ± 1,09 a
Antocianos (mg/L)	494 ± 19 a	468 ± 67 a
Antocianos Ionizados (%)	12,7 ± 0,1 a	12,1 ± 1,1 a
Índice de polimerización	1,36 ± 0,12 a	1,39 ± 0,26 a
Polifenoles totales (IPT)	39,7 ± 1,9 a	38,3 ± 5,6 a

Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,10$) según el análisis de la varianza.

4.4. Diversidad microbiana

Los resultados obtenidos muestran, tal y como se ha indicado en los apartados anteriores, que la diversidad en las levaduras durante la fermentación alcohólica de los vinos era mayor en los vinos obtenidos de las vides tratadas con Sonata que en los testigo; tanto la diversidad intraespecífica, es decir la variedad de clones distintos dentro de la especie *S. cerevisiae*, como interespecífica de diversidad de especies no-*Saccharomyces* encontrada. Estos resultados están en concordancia con otros estudios que ponen de manifiesto que la utilización en bodega de una cepa seleccionada comercial que se implanta favorablemente en los vinos indica que se encuentra bien adaptada a las características del vino de esa bodega, y conlleva una consecuente reducción en la diversidad microbiológica de la fermentación alcohólica (de Celis *et al.*, 2019). Además cabe señalar que la cepa comercial (Uvaferm VRB) era una cepa autóctona de los vinos de la D.O.Ca. Rioja seleccionada por el grupo de investigación del CIDA y posteriormente comercializada.

Los mostos de Tempranillo tinto que tradicionalmente se han venido produciendo en la bodega provienen de uvas con tratamiento de azufre en el viñedo y la levadura implantada en la bodega es evidentemente la mejor adaptada para dirigir las fermentaciones alcohólicas en esas condiciones. En nuestro caso, el mosto obtenido del viñedo tratado con Sonata permitió la presencia de especies no-*Saccharomyces* y de una diversidad de clones *S. cerevisiae* que pudieron competir durante la fermentación alcohólica con el clon I (Figura 8) en las nuevas condiciones de una menor presencia de azufre en el mosto.

En los vinos obtenidos de las uvas con el tratamiento de Sonata encontramos aislados del género *Hanseniaspora*. Levaduras de este género se encuentran en vinos durante momentos iniciales de la fermentación y en fermentaciones espontáneas (Bougreau *et al.*, 2019) y se han asociado con un aumento de la complejidad del flavor del vino y con la generación de metabolitos volátiles, glicerol y acetato (Mendoza *et al.*, 2007).

Respecto a la diversidad de las bacterias lácticas que desarrollaron la FML en los vinos estudiados, fueron en todos los casos de la especie esperada para esta fermentación secundaria y que es la que lidera de forma habitual la FML: *Oenococcus oeni* (López *et al.*, 2007). En los vinos de nuestro estudio la diversidad clonal encontrada fue de seis y siete clones, lo cual concuerda con estudios previos del grupo de investigación que indicaban que las FML espontáneas habitualmente pueden presentar entre 2 y 6 clones de *O. oeni* creciendo simultáneamente en el mismo depósito de fermentación (López *et al.*, 2007).

El control microbiológico de las fermentaciones, tanto de la alcohólica como de la maloláctica, se consigue mediante la inoculación de liófilos seleccionados y adaptados a las condiciones y características de los vinos, lo cual permite una producción de vino con unas características bien controladas por el enólogo. Por otro lado, las fermentaciones espontáneas, como las de nuestro estudio, conllevan una mayor diversidad tanto de especies como de clones distintos dentro de una misma especie, siendo en cualquier caso las especies *S. cerevisiae* y *O. oeni* las predominantes y que lideran las fermentaciones alcohólica y maloláctica respectivamente.

CAPÍTULO 5.

Conclusiones

El tratamiento con “SONATA®”, en relación al tratamiento con azufre:

En la uva:

- No modificó su composición físico-química, y por lo tanto no tuvo influencia en su calidad.
- No afectó al rendimiento ni a la producción.

En la fermentación alcohólica:

- No afectó a la cinética fermentativa, es decir, no perjudicó al crecimiento de las levaduras responsables de la transformación del azúcar en etanol.
- Dio lugar a una mayor proporción de levaduras *no-Saccharomyces*, y dentro de éstas, a una diversidad mayor de especies.
- Permitió una mayor diversidad clonal de las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

En la fermentación maloláctica:

- Acortó su duración en 6 días.
- Afectó a la identidad clonal de las cepas de *Oenococcus oeni* encontrándose únicamente 2 clones comunes entre los dos tipos de vinos (con tratamiento de Sonata en viñedo, y testigos sin el tratamiento).

En el vino:

- Dio lugar a un incremento de la acidez volátil, probablemente debido a una mayor presencia de levaduras *no-Saccharomyces* durante la fermentación alcohólica.
- No influyó en el resto de los parámetros físico-químicos analizados.

CONCLUSIÓN GENERAL

El tratamiento de la uva con el antioídio biológico, realizado en diferentes momentos después del cuajado, posterior a los tratamientos químicos previos, no influyó negativamente en la calidad de la uva, no afectó al desarrollo de la fermentación alcohólica y mejoró la cinética de la fermentación maloláctica.

Referencias

Referencias bibliográficas.

- Arias, A., Barrios, S. G., Cabezuelo, L. R., Cocolla, R. R., Garcia, L. A., Lopez, G. M., Morales, S. G. 2004. Los parásitos de la vid. Estrategias de protección razonada. Ed.: Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Ediciones Mundi-Prensa.
- Bert, F., Branger, C., Lambert-Zechovsky, N. 1997. Pulsed-field gel electrophoresis is more discriminating than multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for typing pyogenic streptococci. *Current microbiology*, **34**(4), 226-229.
- Bougreau, M., Ascencio, K., Bugarel, M., Nightingale, K., Loneragan, G. 2019. Yeast species isolated from Texas high plains vineyards and dynamics during spontaneous fermentations of Tempranillo grapes. *PLOS ONE*; **14**(5):e0216246.
- Bourguignon, D. 2017. EU policy and legislation on pesticides. Plant protection products and biocides, disponible en: [http://www.europarl.europa.eu/thinktank/en/document.html?reference=EPRS_IDA\(2017\)599428](http://www.europarl.europa.eu/thinktank/en/document.html?reference=EPRS_IDA(2017)599428)
- de Celis, M., Ruiz, J., Martín-Santamaría, M., Alonso, A., Marquina, D., Navascués, E., Gómez-Flechoso, M.Á., Belda, I., Santos A. 2019. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneous and inoculated fermenting grapes from Spanish vineyards. *Lett Appl Microbiol.* **68**(6):580-588
- Delgado Cobos, P. 2014. Legislación sobre productos fitosanitarios. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.-Centro Nacional de Medios de Protección. Sevilla. Disponible en https://www.insst.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/sst_87_enlaces.pdf
- EPA, 2004. Technical Document for *Bacillus pumilus* QST 2808, US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Program. Disponible en: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/decision_PC-006485_16-Nov-04.pdf
- Garijo, P. 2013. Estudio del aire como vía de diseminación de microorganismos enológicos. Tesis doctoral. Universidad de La Rioja.
- Gutiérrez, A. R. 1994. Selección de levaduras vínicas en la DOC Rioja. Tesis Doctoral, Universidad del País Vasco.
- Hidalgo Togores, J. 2010. Tratado de enología (Vol. 1 y 2). Mundi-Prensa Libros. Madrid.
- Kurtzman, C.P., and Robnett C.J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **73**(4):331-371.
- López, I. 2004. Detección y control por técnicas de la Biología Molecular de bacterias lácticas autóctonas responsables de la fermentación maloláctica en vinos de la D.O.Ca. Rioja. Tesis Doctoral. Universidad de La Rioja.
- López, I., Tenorio, C., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., Ruiz-Larrea, F. 2007. Evidence of mixed wild populations of *Oenococcus oeni* strains during wine spontaneous malolactic fermentations. *European Food Research and Technology* **22**: 215-223.
- Mendoza, L.M., de Nadra, M.C., Farías, M.E. 2007. Kinetics and metabolic behavior of a composite culture of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* wine related strains. *Biotechnol Lett.* **29**:1057-1063.
- Mukhtar, T., Afridi, M. S., McArthur, R., Van Hamme, J. D., Rineau, F., Mahmood, T. 2018. Draft

Genome Sequence of *Bacillus pumilus* SCAL1, an endophytic heat-tolerant plant growth-promoting bacterium. *Genome announcements*, **6**(18).

Ough, C.S. 2012. Acids and amino acids in grapes and wine. *In: Wine Analysis*. Ed.: Hans-Ferdinand Linskens, John F. Jackson. Springer Science & Business Media. pp 98-99.

Pérez Marín, J. L. 2012. Plagas y Enfermedades del Viñedo en La Rioja. Ed.: Gobierno de La Rioja, Logroño.

Querol, A., Barrio, E., Ramón, D. 1992. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, **15**(3), 439-446.

Reglamento, C. E. E. 2676/90 de la Comisión, de 17 de Septiembre de 1990; por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. Disponible en: <https://publications.europa.eu/es/publication-detail/-/publication/f2adaa59-5c0f-4691-aced-74aa67e37546/language-es>

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A. 2003. Tratado de Enología. 1. Microbiología del vino. Ediciones Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.

Santamaría Aquilué, P. 2009. Ecología de la Fermentación Alcohólica en la DOCA Rioja: Selección de Levaduras para la Elaboración de Vinos Tintos. Tesis Doctoral. Universidad de La Rioja.

Santamaría, P., Garijo, P., López, R., Sanz, S., Olarte C., y Gutiérrez, A.R. 2005. Estudio de las levaduras presentes en las instalaciones de distintas bodegas de la D.O.Ca. Rioja. *Tecnología del vino*, **24**, 47-50

Shafi, J., Tian, H., Ji, M. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **31**(3), 446-459.

Imágenes.

- **Figura 1. Síntomas del oídio:** extraído de <http://www.vitivinicultura.net/oidio-de-la-vid.html>

- **Figura 2 A. *Bacillus pumilus*,** extraída de <http://blog.coralwonders.com/bacterias-en-el-acuario-marino/bacillus-pumilus-bacteria/>;

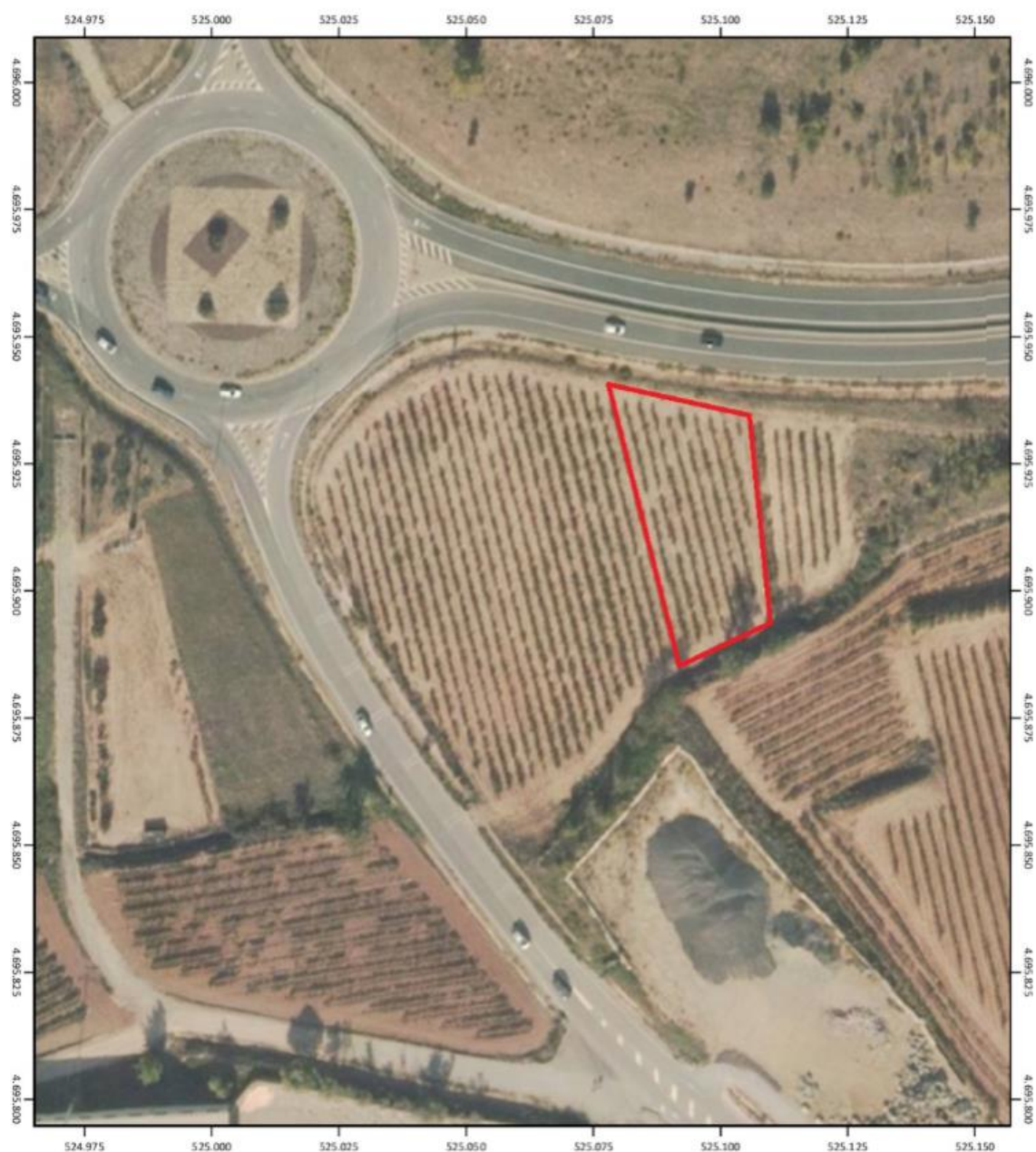
- **Figura 2 B. Colonia de *B. pumilus*,** extraída de <https://blogs.longwood.edu/pecmicrobes/bacillus-pumilus-colony-13a/>

- **Figura 3.** Extraído de la Tesis Doctoral de Garijo, P. 2013.

ANEXO I.

Parcela de ensayo. Datos agronómicos

		MINISTERIO DE AGRICULTURA Y PESCA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE		FONDO ESPAÑOL DE GARANTÍA AGRARIA		SISTEMA DE IDENTIFICACION DE PARCELAS AGRICOLAS	
ORTOFOTO Y PARCELARIO SUPERPUESTO							
DATUM	WGS84	HUSO	30	ESCALA	1 : 1500	FECHA DE IMPRESION	17/12/2018



Ortofoto y parcelario superpuesto. Fuente: SIGPAC.

Tabla 8. Calendario de tratamientos y condiciones microclimáticas del proyecto.

TRATAMIENTO		A	B	C	D	E
Fecha		27-jun	10-jul	23-jul	07-ago	22-ago
Estadio BBCH	Mayoría/%	71/90	73/60	75/75	79/90	81/90
	Mínimo/%	57/10	71/25	75/75	77/02	79/05
	Máximo/%	71/90	75/15	77/75	81/08	83/05
Caldo	L./Ha.	500	500	600	500	500
Humedad relativa	%	70	57	65	54	70
Temperatura	°C	20	23	21	25	22
Nubosidad	%	100	0	0	0	0
Rocío		no	no	no	no	no
Temperatura suelo	°C	22	19	21	24	22
Humedad suelo		ligeram. Seco	muy mojado	ligeram. Seco	lig. Seco	seco
Altura cultivo	cm.	150	160	150	140	140
Altura tratada	cm.	125	140	150	140	140
Atomizador	Stihl SR430					
SONATA ASO	5 L./Ha.					
Elosal GD(azufre80%)	4 Kg./Ha.					

Régimen hídrico y térmico de la parcela.

Los datos registrados por la estación agroclimática del Servicio de Información Agroclimática de La Rioja (SIAR) localizada en Arenzana de Abajo reflejan que el año 2018 fue un año más lluvioso de lo normal. En este sentido, se registraron 632,2 mm acumulados desde el final del ciclo anterior (1 de noviembre de 2017), hasta el 31 de octubre de 2018. Estas lluvias han sido en general muy repartidas, excepto en el mes de agosto que fue muy seco acumulando únicamente 0,2 mm. El mes más lluvioso fue enero al registrar 108,6 mm.

En cuanto al régimen de temperaturas, el mes más frío del ciclo fue febrero con una temperatura media de 4 °C. Por su parte, los meses de verano registraron temperaturas medias de 18,0, 21,1, 21,2 y 18,9 durante los meses de junio, julio, agosto y septiembre, respectivamente. En el mes de agosto, se registraron temperaturas máximas por encima de los 33 °C durante 8 días.

ANEXO II.

Tablas de datos

Tabla 9. Evolución de la densidad (g/L) durante la fermentación alcohólica. Se muestran las medias y las desviaciones estándar.

EVOLUCIÓN DE LA DENSIDAD										
Fecha	17/10/2018	18/10/2018	19/10/2018	21/10/2018	22/10/2018	23/10/2018	24/10/2018	25/10/2018	26/10/2018	29/10/2018
Días	0	1	2	4	5	6	7	8	9	12
T-1	1100	1100	1105	1096	1092	1062	1033	1011	1002	996
T-2	1100	1100	1101	1099	1095	1068	1043	1022	1010	997
T-3	1100	1100	1100	1097	1070	1041	1020	1007	999	995
T-4	1105	1105	1099	1099	1065	1033	1014	1001	996	996
Testigo	1101	1101	1101	1098	1081	1051	1028	1010	1002	996
Desv est	3	3	3	2	15	17	13	9	6	1
SO-1	1095	1095	1095	1091	1083	1055	1026	1010	999	996
SO-2	1101	1101	1101	1098	1092	1082	1051	1021	1005	996
SO-3	1097	1097	1098	1093	1082	1048	1023	1006	998	996
SO-4	1107	1107	1107	1100	1090	1064	1030	1010	1000	996
Sonata	1100	1100	1100	1096	1087	1062	1033	1012	1001	996
Desv Est	5	5	5	4	5	15	13	6	3	0

Tabla 10. Evolución de la fermentación maloláctica mediante la degradación del ácido málico (datos en g/L)

Fecha	30/10/2018	06/11/2018	13/11/2018	21/11/2018	27/11/2018	28/11/2018	29/11/2018	03/12/2018	05/12/2018	07/12/2018
Días	0	7	14	22	27	28	29	33	35	37
T-1	2,51	2,48	2,44	2,45	2,08		1,66	0,01		
T-2	2,59	2,58	2,53	2,52	2,37		2,26	1,43	0,77	0,02
T-3	2,62	2,56	2,53	2,54	2,42		2,42	1,54	0,75	0,00
T-4	2,70	2,70	2,68	2,71	2,45		2,19	0,76	0,00	
Testigo	2,61	2,58	2,55	2,56	2,33		2,13	0,94	0,38	
desv est	0,08	0,09	0,10	0,11	0,17		0,33	0,71	0,44	
SO-1	2,60	2,62	2,58	1,97	0,00	0,00				
SO-2	2,43	2,42	2,36	2,26	0,94	0,37	0,00			
SO-3	2,89	2,89	2,89	2,39	0,00	0,00				
SO-4	2,76	2,71	2,69	2,67	2,61	2,64		1,51	0,63	0,00
Sonata	2,67	2,66	2,63	2,32	0,89	0,75	0,38			
desv est	0,20	0,20	0,22	0,29	1,23	1,27				

Tabla 11. Promedios de los datos de producción, en racimos y kg.

	Racimos/cepa	nº cepas	Total racimos	kg/cepa
Testigo 1	13	37	463	4,8459459
Testigo 2	11	35	396	4,5285714
Testigo 3	12	30	346	4,6433333
Testigo 4	8	32	264	3,0906250
Sonata 1	12	36	419	4,9388889
Sonata 2	11	30	340	4,6700000
Sonata 3	10	31	318	4,3290323
Sonata 4	8	37	285	2,9783784

Tabla 12. Datos enológicos de los mostos.

Muestra	Peso 200 bayas	BRIX EN UVA	° prob	pH	Acidez Total	Tartárico (g/L)	Ac. Málico (g/L)	Potasio (mg/L)	Intensidad de color mosto	Glucónico	IPT MOSTO	NFA mosto BODEGA
T-1	540,20	21,9	12,69	3,53	4,56	6,63	1,90	1662	3,76	0,13	14,34	132
T-2	534,10	22,0	12,76	3,55	4,67	6,31	2,21	1670	3,93	0,12	14,72	130
T-3	501,40	22,5	13,11	3,56	4,45	6,45	1,92	1696	3,70	0,15	15,91	123
T-4	515,10	23,4	13,73	3,59	4,89	6,69	2,39	1960	4,25	0,16	16,71	145
Testigo	522,70	22,45	13,07	3,56	4,64	6,52	2,11	1747	3,91	0,14	15,42	132,50
SO-1	523,20	21,7	12,56	3,57	4,63	6,43	2,23	1715	3,28	0,11	14,08	120
SO-2	537,90	22,4	13,04	3,55	4,78	6,73	2,22	1849	3,83	0,08	15,17	130
SO-3	477,70	21,8	12,63	3,50	5,04	6,74	2,56	1808	4,51	0,07	15,10	131
SO-4	522,40	23,1	13,52	3,55	4,93	7,01	2,41	2039	4,39	0,17	19,17	150
Sonata	515,30	22,25	12,94	3,54	4,85	6,73	2,36	1853	4,00	0,11	15,88	132,75

Tabla 13. Datos enológicos de los vinos tras la fermentación maloláctica.

	Grado	pH	Acidez total	Glu+Fruc.	Acidez volátil	Ác. Tartárico (g/L)	Ác. Málico (g/L)	Ác. Láctico (g/L)	SO2 L	SO2 T	K
C-1	13,80	3,63	4,85	0,03	0,34	1,67	0,01	1,58	34,13	72,08	1115
C-2	13,70	3,67	4,45	0,35	0,37	1,94	0,02	1,66	38,99	69,04	1139
C-3	14,30	3,72	4,41	0,02	0,35	2,04	0,00	1,65	35,34	66,00	1231
C-4	14,40	3,84	4,46	0,00	0,35	1,88	0,00	1,73	41,42	72,08	1519
Media	14,05	3,72	4,54	0,10	0,35	1,88	0,01	1,66	37,47	69,80	1251
So-1	12,70	3,73	4,22	0,01	0,60	1,59	0,00	1,68	34,13	66,00	1241
So-2	13,75	3,64	4,45	0,10	0,51	1,78	0,00	1,58	34,13	69,04	1269
So-3	13,1	3,80	4,19	0,00	0,72	1,55	0,00	1,87	36,56	72,08	1392
So-4	14,3	3,84	4,63	0,02	0,79	1,85	0,00	1,89	35,34	66,00	1679
Media	13,46	3,75	4,37	0,03	0,66	1,69	0,00	1,76	35,04	68,28	1395

ANEXO III.

Medios de cultivo y soluciones

MEDIOS DE CULTIVO Y DISOLUCIONES

Disoluciones base

Tris ClH 1 M, pH = 8:

TRIS base	121.1 g
HCl 37%	42 mL
Agua destilada, csp	1000 mL

Ajustar a pH = 8 con HCL y enrasar. Esterilizar a 121 °C durante 20 min.

EDTA 0.5, pH = 8:

EDTA	186.1 g
Agua destilada, csp	1000 mL

Ajustar a pH= 8 con NaOH y enrasar. Esterilizar a 121 °C durante 20 min.

Medios para aislamiento y conservación

(CGA) Cloranfenicol glucosa agar. Medio utilizado para el aislamiento de levaduras a partir de las muestras tomadas en los distintos momentos de fermentación.

Extracto de levadura	5 g
D (+) Glucosa	20 g
Cloranfenicol	0.5 g
Agar	17 g
Agua destilada, csp	1000 mL

Se utilizó un medio deshidratado preparado (42.5 g/L, pH = 6.6 ± 0.2) y se esterilizó a 118 °C durante 15 min.

Agar de Malta. Medio utilizado para la conservación de las levaduras aisladas.

Extracto de malta	5 g
Agar	20 g
Agua destilada, csp	1000 mL

Una vez preparado se esterilizó a 120 °C durante 20 min.

Medios de crecimiento.

Yeast Peptone Dextrose (YPD). Se empleó para el crecimiento masivo de cada colonia aislada, tanto en forma sólida, como en líquida (sin agar). Se esterilizó a 120 °C durante 15 min.

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
Agua destilada, csp	1000 mL

Disoluciones empleadas en el análisis del DNAm.**Extracción del DNA:**

Solución 1: Sorbitol 0.5 M + EDTA 0.5M (pH = 8), pH = 7.5

Solución de Zimoliasa: 1.5 mg de zimoliasa en 1 ml de Solución 1

Solución 2: Tris HCl 50 mM + EDTA 20 mM, pH = 7.4

Solución de SDS: 10% p/v, pH = 7.2 con HCl concentrado

Acetato potásico 5 M: 49 g de acetato en 100 ml de agua, pH = 4.8 con acético glacial

Tampón TE: Tris ClH 10 mM + EDTA 1 mM

Gel tinción de bandas:

Agarosa 1% en tampón TBE (1:10)

Tampón TBE:

Tris base 54,0 g

Ácido bórico 54,0 g

EDTA 0.5 M, pH = 8 54,0 g

Agua destilada, csp 1000 mL

Solución de bromuro de etidio (Bio-Rad): 0.1 mg/ml.

Pool de PCR:

Buffer (sin MgCl₂) 10x NH₄ de BIOLINE..... 5 µL

MgCl₂ 50mM de BIOLINE..... 3.5 µL

dNTPs 50µM (12.5µM de cada dNTP) de BIOLINE..... 1 µL

M13 100µM..... 1 µL

BIOTAQ DNA pol 5U/µL de BIOLINE..... 0.4 µL

Agua PPI..... 37.5 µL

MRS modificado (Man, Rogosa and Sharpe)

Empleado para recuento y aislamiento de bacterias lácticas, más selectivo para *O. oeni*.

MRS broth 52 g

D-fructosa 6 g

DL-málico 5 g

L-cisteína HCl 0,5 g

Pimaricina VGP, S.L. 50 mg

Agar bacteriológico 30 g

Suero de tomate 100 mL

Agua destilada 900 mL